低剂量多杀菌素继代处理对小菜蛾 nAChR 基因表达的影响

尹显慧[1]，吴青君[2,*]，张友军[2]，龙友华[1]，吴小毛[1]，李荣玉[1]，
李　明[1]，赵赞伟[1]，王　英[1]

（1. 贵州大学作物保护研究所，贵阳 550025；2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081）

摘要：【目的】探索多杀菌素对小菜蛾 *Plutella xylostella* 长期胁迫下的亚致死效应。【方法】采用低剂量(LC_{25})多杀菌素进行继代处理，应用叶片浸渍饲喂法分别测定不同处理世代小菜蛾种群 Sub 对多杀菌素的敏感性水平，并运用实时定量 PCR 法进一步检测低剂量多杀菌素处理后小菜蛾 4 龄幼虫烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR) α 亚基基因表达量变化。【结果】随着处理世代的增加，小菜蛾对多杀菌素的敏感性下降，至第 10 代(Sub10)其抗性倍数为 2.70 倍；同时对小菜蛾 nAChR α 亚基基因表达呈现一定的抑制作用，Sub10 中 nAChR α 亚基基因的相对表达量较敏感种群 SS 下降了 32.04%，且差异显著；而抗性种群 RR(抗性倍数 17.85) nAChR α 亚基基因的相对表达量仅为 SS 的 0.37 倍。【结论】小菜蛾对多杀菌素敏感性可能与 nAChR α 亚基基因的表达量有关。本研究可为探究多杀菌素长期低剂量处理对小菜蛾抗药性发展的潜在影响提供一定依据。

关键词：小菜蛾；多杀菌素；抗药性；烟碱型乙酰胆碱受体；基因表达

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2016)11-1182-07

Expression of nicotinic acetylcholine receptor gene in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after long-term exposure to low concentration of spinosad

YIN Xian-Hui[1], WU Qing-Jun[2,*], ZHANG You-Jun[2], LONG You-Hua[1], WU Xiao-Mao[1], LI Rong-Yu[1], LI Ming[1], ZHAO Zan-Wei[1], WANG Ying[1] (1. Institute of Crop Protection, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to investigate the sublethal effects of spinosad on *Plutella xylostella* after long-term exposure to low concentration of spinosad. 【Methods】The Sub strain of *P. xylostella* was continuously selected using the LC_{25} of spinosad. The susceptibility of the 4th instar larvae of various sub-populations of *P. xylostella* to spinosad was assayed by leaf dip feeding method, and the change of expression level of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) α subunit gene in the 4th instar larvae of *P. xylostella* treated with low concentration of spinosad was determined by quantitative real-time PCR. 【Results】The sensitivity of *P. xylostella* to spinosad decreased across generations. After selection with the LC_{25} of spinosad for ten generations (Sub10), the Sub strain developed 2.70-fold resistance compared with the SS strain. Quantitative real-time PCR analysis indicated that the expression level of nAChR α subunit gene decreased with generations and significantly decreased by 32.04% in the Sub10

基金项目：国家自然科学基金项目(31460481)；国家公益性行业(农业)科研专项(201203038)；贵州大学引进人才科研项目[贵大人基合字(2008)030]

作者简介：尹显慧，女，1978 年 5 月生，贵州贵阳人，博士，副教授，研究方向为农药毒理及使用技术，E-mail: xhyin@gzu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuqingjun@caas.cn

收稿日期 Received: 2016-08-04；接受日期 Accepted: 2016-10-21

generation compared to that in the SS strain, and the expression level in the spinosad resistant strain RR (resistance ratio = 17.85-fold) was only 37% of that in the SS strain. 【Conclusion】This multi-generational study found the possible correlation between spinosad susceptibility and the expression abundance of nAChR α subunit gene in *P. xylostella*, and this is helpful for further understanding of spinosad resistance mechanisms in *P. xylostella*.

Key words: *Plutella xylostella*; spinosad; insecticide resistance; nAChR; gene expression

多杀菌素（spinosad）是由土壤放射菌 *Saccharopolyspora spinosa* 经有氧发酵产生的大环内酯类物质（Thompson *et al.*, 2000），对多种害虫高效。但随着在田间的大量广泛应用，其对有害生物的亚致死效应及害虫对该药剂的抗性问题越来越受到关注（Shono and Scott, 2003; Yin *et al.*, 2009; El-Sheikh, 2015; 徐志红和李俊凯, 2015）。目前关于害虫对多杀菌素的作用机理还不十分明确，大多数研究认为多杀菌素的主要作用靶标是烟碱乙酰胆碱受体（nAChRs），其抗性是由于靶标位点的变异（王东等, 2009）所致，尤其是与 α6 亚基相关（Bao *et al.*, 2014）。如已经证明果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Dα6（Somers *et al.*, 2015）和小菜蛾的 Pxα6（Wang *et al.*, 2016）突变均与多杀菌素的抗性密切相关；但是家蝇 Mdα6 亚基被证实与多杀菌素抗性无关，说明家蝇对多杀菌素的抗性可能存在其他机制（Orr *et al.*, 2009）。还有一些研究发现对多杀菌素的抗性存在代谢抗性机制（Reyes *et al.*, 2012; Herron *et al.*, 2014），因此对多杀菌素的抗性可能存在多种机制。

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是世界性十字花科蔬菜的主要害虫，至今已有很多有关小菜蛾抗药性的报道（Zhao *et al.*, 2002; Li et *al.*, 2012），但大部分集中在田间抗性检测（Hsu and Feng, 2006）、生理生化机制（尹显慧等, 2008）及普通遗传学（王东等, 2009）方面，很少涉及当昆虫长期暴露在低剂量杀虫剂下的适合度、抗药性发生发展及靶标基因表达与调控等。大量研究表明，昆虫抗药性是可遗传的性状，抗性个体的基因组与敏感个体基因组间存在着一定差异，这些差异是导致昆虫对杀虫剂产生抗性的根本原因（Lansdell and Millar, 2004）。近年来，与昆虫抗药性相关的机理研究大多都已经深入到基因水平（Hou *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016）。有报道称溴氰菊酯的长期选择可导致小菜蛾抗性品系和敏感品系基因表达的差异（刘白朵等, 2010）。同样在茚虫威的短期刺激下，小菜蛾的 *ABCG2* 转录水平呈现上升趋势，表现出明显的应激效应（朱航等, 2015）。但是在低剂量杀虫剂长期选择压力下，其种群敏感性变化与靶标基因表达水平的相关性还未见报道。本研究采用低剂量多杀菌素连续处理 10 代后测定小菜蛾对多杀菌素的敏感性变化，并运用荧光定量 PCR 对不同处理世代小菜蛾 nAChR α 亚基基因的表达作定量分析，旨在发现多杀菌素低剂量继代处理对小菜蛾 nAChR α 基因表达的影响，为揭示小菜蛾对多杀菌素的抗性机制及抗性治理提供依据。

1　材料与方法

1.1　试虫及试剂和仪器

供试小菜蛾：小菜蛾敏感种群 SS，2009 年从中国农业科学院蔬菜花卉研究所引入，用结球甘蓝在温室（25 ± 1℃，光周期 16L:8D, RH 60%）连续饲养，期间未接触任何杀虫剂；低剂量处理种群 Sub，多杀菌素 LC_{25} 处理敏感小菜蛾后的种群；抗性种群 RR，采用多杀菌素参照 Zhao 等（2002）报道的方法汰选获得，抗性倍数为 17.85，作为本研究的参照种群。

主要试剂及仪器：多杀菌素（spinosad）原药，美国陶氏益农公司；Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂盒，美国 Invitrogen；QuantiTect™ SYBR Green PCR 试剂盒，天根生化科技有限公司；DNA Marker DL2000、*Taq* DNA 聚合酶、cDNA 反转录试剂盒，日本 TaKaRa 公司；PCR 引物，上海生工生物工程股份有限公司；ABI 7300 Real Time PCR 仪，美国 ABI 公司；PTC-200PCR 仪，美国 MJR 公司；UV-2800 紫外分光光度计，龙尼科（上海）仪器有限公司。

1.2　小菜蛾多杀菌素继代处理及敏感性测定

将 25 g/L 多杀菌素悬浮剂进行梯度稀释，参照 Zhao 等（2002）的叶片浸渍饲喂法进行生物测定，以清水为对照。生物测定结果显示多杀菌素对小菜蛾敏感种群 3 龄幼虫的致死中浓度（LC_{50}）为 0.27 mg/L。本试验选择低剂量 LC_{25}（0.11 mg/L）的多杀菌素浸渍甘蓝叶片，连续饲喂敏感小菜蛾，分别于处理的第 1 代（Sub1）、第 5 代（Sub5）和第 10 代（Sub10）随机选取存活的 4 龄第 1 天幼虫 50 头，迅

速置于液氮中冷却,并于 -80℃ 冰箱中保存备用。于处理的第 5 代和第 10 代测定幼虫对多杀菌素的敏感性。

1.3 小菜蛾总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

按照 Trizol Reagent (Invitrogen) 说明书的步骤分别提取 LC_{25} 剂量多杀菌素处理的 Sub1, Sub5 和 Sub10 代小菜蛾 4 龄第 1 天幼虫的总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,利用核酸检测仪检测 RNA 的纯度,合格后使用 cDNA 反转录试剂盒 (TaKaRa) 将 RNA 反转录合成 cDNA 第一链,产物于 -20℃ 保存备用。以小菜蛾敏感种群 SS 和抗性种群 RR 为参照。

1.4 PCR 扩增 nAChR α 亚基 cDNA 片段

根据 nAChR 保守区设计简并引物 nAChR -F 和 nAChR-R (表 1),用于扩增小菜蛾 nAChR α 亚基的 cDNA 片段。PCR 扩增体系为 50 μL: cDNA 2 μL, 上下游引物各 5 μL, LA Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 10 × Buffer 5 μL, dNTP 2 μL, 去离子水 30.5 μL。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后再 72℃ 10 min。反应结束后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测并回收纯化,与 pGEM-T Easy Vector (Promega) 连接并转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,进行阳性克隆检测,将质粒送样测序。

表 1 小菜蛾 nAChRα 亚基基因扩增所用引物

Table 1 Primers for PCR and qRT-PCR of nAChR α subunit gene in *Plutella xylostella*

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	产物长度(bp) Product size	扩增效率(%) Amplification efficiency
nAChR-F	ATCTGGTTGCCCGACATCGTGCT	423	97
nAChR -R	GTTAACCGTGTAGAACAGGGTTT		
QnAChRα-F	CAATTGGGATGGGAATTACG	214	99
QnAChRα-R	GGAGGACTGGTCCATGTGTT		
18SrRNA-F	CGGCTACCACATCCAAGG	120	99
18SrRNA-R	GCTGGAATTACCGCGGCT		

1.5 荧光定量 PCR 反应体系和条件

利用 Primer 5.0 软件分别设计特异引物 QnAChRα-F 和 QnAChRα-R,同时以 18S rRNA 作为内参基因,特异引物为 18SrRNA-F 和 18SrRNA-R (表 1)。荧光定量 PCR 检测使用 QuantiTect™ SYBR Green PCR 试剂盒进行。反应体系为 25 μL: 2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL、0.2 μmol/L PCR 上下游引物各 0.5 μL、cDNA 模板 2 μL、RNase-free water 9.5 μL。反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 61℃ 30 s, 72℃ 30 s, 80℃ 15 s, 40 个循环。阴性对照以去 RNA 酶的 ddH_2O 为模板,每个样品设置 4 个独立的生物学重复,每个生物学重复设置 4 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量分析 (Livak and Schmittgen, 2001),其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{试验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}$。

总 RNA 经反转录合成 cDNA 后,进行常规 PCR 扩增,分别得到 120 bp 和 214 bp 大小的 18S rRNA 和 nAChR α 亚基片段。在试验设计的浓度范围内 (6 个数量级, Ct 值从 16 ~ 40 之间) 荧光定量 PCR 呈现出较好的线性关系。小菜蛾内参基因 18S rRNA 的标准曲线为: $y = -3.272x + 31.082$, 相关系数 $R^2 = 0.9956$, 扩增效率为 95.7%; 目的基因 nAChR α 亚基基因的标准曲线为: $y = -3.376x + 20.104$, $R^2 = 0.9978$, 扩增效率为 99.1%。表明设定的荧光定量 PCR 参数符合试验要求,可用于定量分析。

1.6 数据分析

用 SAS 统计软件对数据进行单因子方差分析, Tukey 氏 F 检验不同处理间差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 小菜蛾继代处理种群对多杀菌素的敏感性变化

从表 2 可以看出,处理至第 5 代 (Sub5) 时,小菜蛾 3 龄幼虫 48 h 的 LC_{50} 值与 SS 种群的 LC_{50} 值仍无明显差异; 处理到第 10 代时,其 LC_{50} 值为敏感 SS 种群的 2.70 倍,且 95% 置信限没有交叉,差异显著。同时回归方程的斜率也增加了 16.11%,说明多杀菌素低剂量继代处理不仅会使小菜蛾的敏感性下降,还会导致个体的同质性增加。

2.2 小菜蛾 nAChR α 亚基基因 cDNA 片段的克隆

小菜蛾 nAChR α 亚基核苷酸片段长 423 bp,编码 141 个氨基酸 (图 1)。序列比对表明该氨基酸序

表 2　不同小菜蛾种群 3 龄幼虫对多杀菌素的敏感性(48 h)

Table 2　Susceptibility of the 3rd instar larvae of different strains of *Plutella xylostella* to spinosad (48 h)

种群 Strain	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	LC_{50}(95% CL) (mg/L)	抗性倍数* Resistance ratio
SS	$y = 5.96 + 1.49x$	0.95	0.27(0.19 – 0.38)	1.00
Sub5	$y = 5.28 + 1.62x$	0.93	0.28(0.21 – 0.35)	1.03
Sub10	$y = 4.95 + 1.73x$	0.97	0.73(0.56 – 0.93)	2.70
RR	$y = 3.88 + 1.92x$	0.98	4.82(3.81 – 6.10)	17.85

SS：敏感种群 Susceptible strain；Sub5：多杀菌素 LC_{25} 连续选育 5 代后的种群 Spinosad (LC_{25}) selected SS strain for 5 generations；Sub10：多杀菌素 LC_{25} 连续选育 10 代后的种群 Spinosad (LC_{25}) selected SS strain for 10 generations；RR：抗性品系 Resistant strain. * 抗性倍数 = 处理种群 LC_{50}/敏感种群 LC_{50} 的比值。Resistance ratio = LC_{50} of the treated strain/LC_{50} of the SS strain.

列是 nAChR α 亚基位于细胞外 N 段的一部分，具有 nAChR α 亚基的一些典型结构特征，包括两个相邻的半胱氨酸[是受体功能亚基(α 亚基)区别于结构亚基(α 亚基)的确定性特征，见图 1 方框、与烟碱结合有关的氨基酸如色氨酸(单下划线)、参与 α-银环蛇毒素(α-bgt)结合的酪氨酸(双下划线)及一个保守的包含了 15 个氨基酸，形成的胞外环(loop，两个半胱氨酸之间形成二硫键)，这种胞外环是其他配体门控离子通道，如 GABA、谷氨酸和甘氨酸等神经递质受体通道亚基的重要结构特征(灰色阴影)。

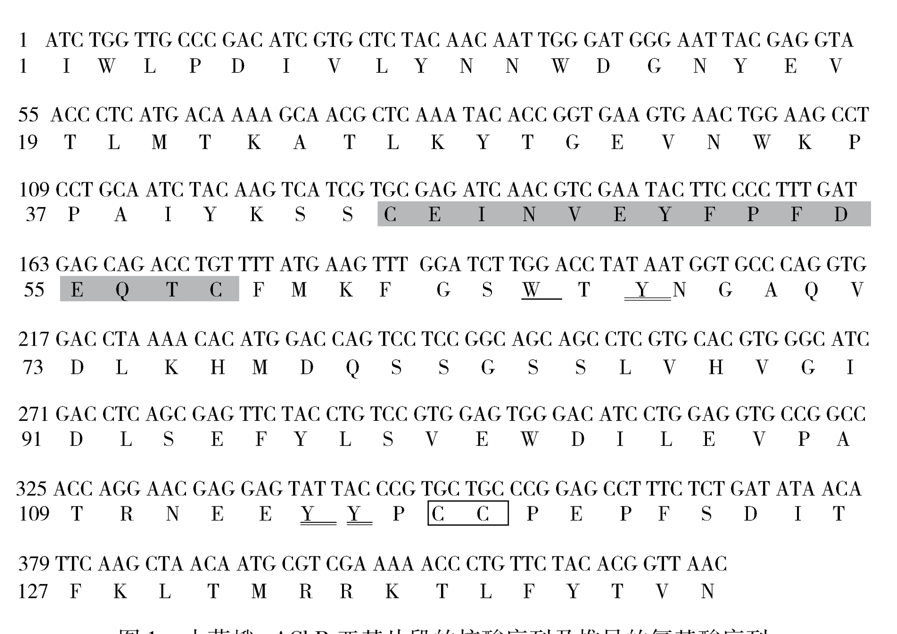


图 1　小菜蛾 nAChR 亚基片段的核酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Partial nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of nAChR α subunit in *Plutella xylostella*

方框内两个相邻的半胱氨酸是受体功能亚基(α 亚基)区别于结构亚基(β 亚基)的确定性特征。单下划线是与烟碱结合有关的氨基酸如色氨酸。双下划线是参与 α-银环蛇毒素(α-bgt)结合的酪氨酸。灰色阴影是 15 个氨基酸形成的胞外环。Two adjacent cysteines marked by black box are deterministic characteristics of receptor subunits (α subunit) different from structural subunits (β subunit). Amino acids related to nicotine binding, such as tryptophan, are underlined. Tyrosine involved in α-coral snake toxins combination is double underlined. The extracellular loop composed of 15 amino acids are shaded in grey.

在 GenBank 中对小菜蛾 nAChR α 亚基的氨基酸序列进行 Blast 同源性搜索，发现它们与家蚕 *Bombyx mori*、二化螟 *Chilo suppressalis*、苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等昆虫的 nAChR 亚基具有很高的同源性(图 2)，尤其与家蚕 nAChR α8 亚基和二化螟 nAChR α8 亚基变种 2 的同源性分别为 80.3% 和 79.4%。

2.3　多杀菌素抗性与敏感种群小菜蛾 nAChR α 亚基基因表达量

由图 3 可知，抗性倍数为 17.85 的多杀菌素抗性种群小菜蛾中的 nAChR α 亚基基因表达量显著低于敏感种群的表达量，以敏感种群小菜蛾 nAChR α 亚基基因表达量作为基准值 1，则抗性种群小菜蛾 nAChR α 亚基基因表达量仅为敏感种群表达量的 0.37 倍。

```
Plutella xylostella          ....MAEPKREPPISELTGKMFR TW ENPDVKRLYDDLLSNYNRLIRPVTNVSDILTVRL LKSPFRLRNC EGRT GAGL AITPAG SQPGEVLQGD   96
Bombyx mori                  ....MNFKLCLLILIVYKGTEAV LL  NPDVKRLYDDLLSNYNRLIRPVTNVSDILTVRL LK    M V   V   L E K F   Q N DD   96
Chilo suppressalis           ....MRLGIICVFFVFVKNSLGV LL  NPDVKRLYDDLLSNYNRLIRPVTNVSDILTVRL LK    M V   V   L E K F   T N DD   96
Cydia pomonella              ....MKLQVVWFFIAFTRTCMGL LL  NPNVKRLYDDLLSNYNRLIRPVTNVSDILTVRL LK    M V   V   L E K F   Q N DE   96
Tribolium castaneum          ..............MLFKSTEAS HI  NPHAKRLYDDLLSNYNRLIRPVENHTQTLTVWL LK    I M   V   L V R Y   K E EE   86
Leptinotarsa decemlineata    MDLLKCELCVCFLVILLNNVSAI HI  NPDAKRLYDDLLSNYNRLIRPVINHTETLTVWL LK    I M   I   L V K Y   R D EE  100
Consensus                                                np  krlyddllsnynrlirpv n    ltv l lk            l

Plutella xylostella          VG RQTGFPSHDVVIQTTASELYYGTHYREHIWLPDIVLYNNWD NYEVTLMTKAT KYTGEVNWKPPAIYKSSCEINVEYFPFDEQTCFMKFGSWTY   196
Bombyx mori                          .......................EHIWLPDIVLYNNWD NYEVTLMTKAT KYTGEVNWKPPAIYKSSCEINVEYFPFDEQTCFMKFGSWTY   176
Chilo suppressalis                   .......................EHIWLPDIVLYNNWD NYEVTLMTKAT KYTGEVNWKPPAIYKSSCEINVEYFPFDEQTCFMKFGSWTY   176
Cydia pomonella                      .......................EHIWLPDIVLYNNWD NYEVTLMTKAT KYTGEVNWKPPAIYKSSCEINVEYFPFDEQTCFMKFGSWTYS  176
Tribolium castaneum                  .......................EHIWLPDIVLFNNAD NYEVTLMTKAT SYTGEVIWKPPSIYKSSCEINVQYFPFDEQSCIMKFGSWTY   166
Leptinotarsa decemlineata            .......................EHIWLPDIVLFNNADRNYEVTLMTKAT SYTGEVIWKPPSIYKSSCEINVQYFPFDEQSCIMKFGSWTY   180
Consensus                                                   ehiwlpdivl nn d nyevtlmtkat  ytgev wkpp iykssceinv yfpfdeq c mkfgswty

Plutella xylostella          GAQVDLKHMDQSSG SLVHVGIDLSEFYLSVEWDILEVPATRNEEYYPCCP.EPFSDITFKLTMRRKTLFYTVNLIIPCVGLTFLTVLVFYLPSDTGEKI   295
Bombyx mori                  GAQVDLKHMDQSSG SLVHVGIDLSEFYLSVEWDILEVPATRNEEYYPCCP.EPFSDITFKLTMRRKTLFYTVNLIIPCVGLTFLTVLVFYLPSD GEKI   275
Chilo suppressalis           GAQVDLKHMDQSPG SLVHVGIDLSEFYLSVEWDILEVPATRNEEYYPCCP.EPFSDITFKLTMRRKTLFYTVNLIIPCVGLTFLTVLVFYLPSD GEKI   275
Cydia pomonella              GFQVDLKHMDQPAG SLVHVGIDLSEFYLSVEWDILEVPATRNEEYYPCCPNEPFSDITFKLTMRRKTLFYTVNLIIPCVGLTFLTVLVFYLPSD GEKI   276
Tribolium castaneum          GLQVDLKHMDQVSGNNIVKVGIDLSEFYLSVEWDILAVPATRNEEYYPCCT.EPYSDITFKITMRRKTLFYTVNLIIPCVGITFLTVLVFYLPSD GEKV   265
Leptinotarsa decemlineata    GLQVDLKHMDQISG NIVKVGIDLSEFYLSVEWDILAVPATRNEEYYPCCS.EPYSDITFKITMRRKTLFYTVNLIIPCVGITFLTVLVFYLPSD GEKV   279
Consensus                    g qvdlkhmdq  g   v vgidlsefylsvewdil vpatrneeyypcc  ep sditfk tmrrktlfytvnliipcvg tfltvlvfylpsd gek

Plutella xylostella          SRISILVSLTVFFLLLAEIIPSTFPAMPLLGKY RFTMYLVSLSVWNTVCMQK HF SPSTHTMSTWKKKLFLCSSRCRKFSIKKRTTY LPD  STFV   395
Bombyx mori                  S SISILVSLTVFFLLLAEIIPST  AIPLLGKY  FTM LVSLSVWMTVCVL HF SPSTHTMS WMKKLFLQL      M  ..RTKY LPD  TFV   373
Chilo suppressalis           S CISILVSLTVFFLGLAEIIPPT  AIPLLGKY  FTM LVSLSVWVTVCIV HF SPSTHTMS WMKKLFLQF      M  ..RTKY LPD  TFV   373
Cydia pomonella              S CISILVSLTVFFLGLAEIIPPT  AIPLLGKY  FTM LVSLSVWVTVCIL HF SPSTHTMS WMKKLFLQL      M  ..RTKY LPE  TFV   374
Tribolium castaneum          T CVSILLSLTVFFLLLAEIIPPT  AVPLLGKY  FTM LVTSSIWVTVCVL HF SPSTHKMS IVRKIFLQF      I  ..RTTYTLPE  SLP   363
Leptinotarsa decemlineata    T CVSILLSLTVFFLLLAEIIPPT  AVPLLGKY  FTM LVTSSIWVTVCVL HF SPSTHKMS IFRKIFLHF      I  ..RTKY LPE  SQP   377
Consensus                       sil sltvffl laeiip t  a pllgky  ftm lv  s w tvc    hf spsth ms    k fl           rt y lp

Plutella xylostella          SNGY  LETSRDSSLTDAFGDS CDN.GDYPDSSNTLKMLTR.....RP VTESEIMRSSK SSCQWCWTASFSGCSP..DADKDNEVIEDWKFMSMV   487
Bombyx mori                  SNGY  LEMSRD.SLTDAFGDS CDN.GDYRKSPAPEDDMMGASA QRP VTESENML RH PE AA LKS         KDADKDNEVIEDWKFMSMV   471
Chilo suppressalis           SNGY  LEMSRD.SLTDAFGDS NGDSGDYRKSPAPEDDILAGSA QRP VTESENMI RH PE AA LQS         KDADKDNEVIEDWKFMSMV   472
Cydia pomonella              SNGY  LEMSRD.SLTDAFGDS NGDNGDYRKSPNPEDDMMAAGG QRP VTESENML RH PE AA LQS         KDADKDNEVVEDWKFMSMV   473
Tribolium castaneum          PRGYSG IEMQLN.MRDPFNTDF..................KMKA SSM .SSNIT.. RF AN LS LQG         RDADKDNEIVEDWKFVSMV   440
Leptinotarsa decemlineata    PRGY  MEIQLN.MGEPFTTDF ITTREPSFVLQNNEQEDAKMKA SSMTGSSNMT.. KM EN LA FQG         RDADKDNEIVEDWKFVSMV   474
Consensus                      gy    e          d                                                    dadkdne  edwkf smv

Plutella xylostella          LDS SLWLFT ACFVGT GII QSPSLYDTR PV QQISSIPMKKNNFFYP DIET GII    547
Bombyx mori                  LD   LWLFT ACFVGT GII QSPSLYDTR PV QQISSIPMKKNNFFYP DIET GII    531
Chilo suppressalis           LD   LWLFT ACFVGT GII QSPSLYDTR PV QQISSIPMRKNNFFYP DIET GIV    532
Cydia pomonella              LD   LWLFT ACFVGT GII QSPSLYDTR PV QQISSIPMRKSNFFYP GIET GII    533
Tribolium castaneum          LD   LWVFT ACIGGT GII QAPSLYDTR PVHQQISEIPLTKIFQIPPSRTHIPTQ.    499
Leptinotarsa decemlineata    LD   LWVFT ACIGGTCGII QAPSLYDTR PV QQISEIPLNKIFQLPP QVPF ...    531
Consensus                    ld   lw ft ac  gt gii q pslydtr pv qq s ip  k     p
```

图 2　小菜蛾 nAChR α 亚基与其他昆虫 nAChR 的氨基酸序列比对

Fig. 2　Alignment of amino acid sequences of nAChR α subunit of *Plutella xylostella* with nAChR of other insect species

nAChR 亚基序列来源及其 GenBank 登录号 Origin of nAChR sequences and their GenBank accession numbers：小菜蛾 *Plutella xylostella*；家蚕 *Bombyx mori*，NP_001166817.1；二化螟 *Chilo suppressalis*，AKQ12753.1；苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*，AJA39823.1；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*，EEZ99341.2；马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*，ACJ64922.1. Consensus：共有序列 Consensus. 下划线部分为简并引物克隆的片段。The cDNA fragment cloned with degenerate primers is underlined.

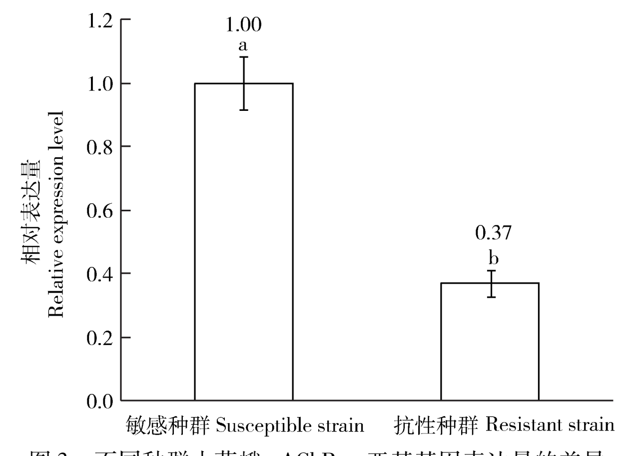


图 3　不同种群小菜蛾 nAChR α 亚基基因表达量的差异

Fig. 3　Expression abundance of nAChR α subunit gene in larvae of different strains of *Plutella xylostella*

图中数据为平均数 ± 标准误，柱上不同字母代表经 Tukey 氏 *F* 检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著；下图同。Data are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference by Tukey's *F* test ($P < 0.05$). The same below.

2.4　多杀菌素低剂量处理对 nAChR α 亚基基因表达量的影响

采用多杀菌素低剂量 LC_{25} 对小菜蛾进行继代处理 1 代和 5 代后，抗性倍数无明显变化，同样 nAChR α 亚基基因的相对表达量与 SS 在 $P = 0.05$ 水平上差异不显著；至第 10 代，抗性倍数增至 2.70 倍，α 亚基 mRNA 相对表达量相对于 SS 下降了 32.04%，差异显著(图 4)。说明多杀菌素低剂量处理 10 代后，随着抗性倍数增加，nAChR α 亚基基因的表达被明显抑制。

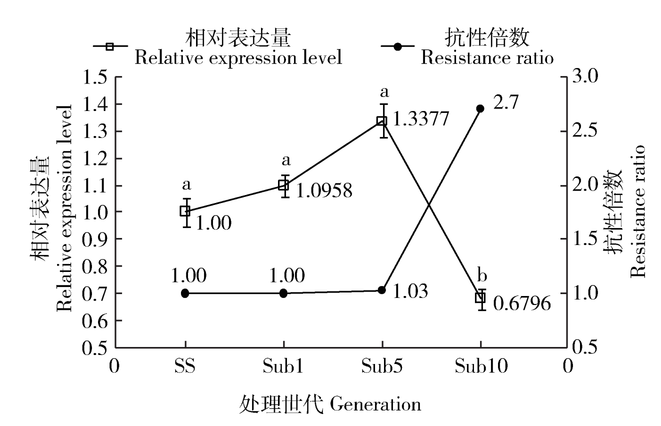


图 4　nAChR α 亚基基因在多杀菌素低剂量处理小菜蛾 4 龄幼虫中的相对表达量

Fig. 4　Relative expression level of nAChR α subunit gene transcript in the 4th instar larvae of *Plutella xylostella* after long-term exposure to low concentration of spinosad

SS：敏感种群 Susceptible strain；Sub1：多杀菌素 LC_{25} 选育 1 代后的种群 Spinosad (LC_{25}) selected SS strain for one generation；Sub5：多杀菌素 LC_{25} 连续选育 5 代后的种群 Spinosad (LC_{25}) selected SS strain for 5 generations；Sub10：多杀菌素 LC_{25} 连续选育 10 代后的种群 Spinosad (LC_{25}) selected SS strain for 10 generations.

3 讨论

随着害虫对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类等药剂产生较高的抗性，新烟碱类杀虫剂已成为蔬菜害虫的有效防治药剂（张梅凤等，2009）。本研究表明小菜蛾长期在亚致死浓度的多杀菌素胁迫下，同样会导致对多杀菌素的敏感性下降。Vogt 等（2007）采用亚致死剂量的三丁基锡（tributyltin）处理摇蚊 *Chironomus riparius*，前 4 代死亡率逐渐增加，但是从第 5 代到第 11 代，其死亡率则逐渐下降。Gong 等（2015）分别采用 LC_{10} 和 LC_{25} 的多杀菌素处理西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*，处理 32 代后 LC_{25} 处理种群的 LC_{50} 值是 LC_{10} 处理的 4 倍，并且西花蓟马的适合度有所增加。可见，低剂量杀虫剂长期胁迫对害虫抗药性的发展也有明显促进作用。如果只是以一次生物测定的结果来判断杀虫剂的毒力，而忽略了低剂量杀虫剂长期胁迫对昆虫抗药性的影响，就会影响对杀虫剂药效的全面评价。但目前有关低剂量药剂长期处理对昆虫抗药性影响的报道并不多。因此，有必要加强对这方面的研究。

昆虫抗药性除了靶标位点的基因突变引起外，靶标基因表达量的变化也可能会引起害虫对药剂敏感性的变化。例如低剂量氯虫苯甲酰胺分别连续处理和间隔处理均可提高小菜蛾鱼尼丁受体基因的表达量，且长期筛选获得的抗性种群的表达量也显著增加（孙丽娜等，2012）。基因表达量发生变化可能与其稳态响应机制有关，即在受到外界不良环境胁迫时（如药剂胁迫），昆虫会启动稳态响应机制，这种机制会使其细胞免受外来物质的毒害，在此过程中存在能量平衡现象（Morgan，2001），即某些基因表达量上调需要更多的能量，导致能量的再分配，而其余基因表达量不变或者下调。Sun 等（2013）通过比较蛋白组学的方法对溴氰菊酯敏感品系和抗性品系的蚊群鉴定分析，发现抗性品系中蛋白酶体 β6 亚基（PSM β6）的表达量较高，又通过抑制剂和分子生物学方法研究 PSM β6 在溴氰菊酯抗性中的作用，结果显示蛋白酶抑制剂可提高抗性品系细胞和幼虫对溴氰菊酯的敏感性，而 PSM β6 基因的敲除则大大降低了溴氰菊酯胁迫下细胞的存活率，从而认为 PSM β6 与蚊群对溴氰菊酯的抗性密切相关。本试验中多杀菌素低剂量短期处理，小菜蛾 nAChR α 亚基基因的表达无明显变化，但随着选育代数增加，昆虫种群中纯合子相对数量增加，逐渐表现出抗性趋向，出现了 nAChR α 亚基基因的表达被抑制，这与 Wang 等（2016）报道在高抗小菜蛾种群 nAChR α6 亚基第 4 个跨膜结构上发现有 3 个氨基酸缺失的结果一致。本实验参照抗性种群的抗性倍数不高，种群中有大量的杂合子，但 nAChR α 亚基基因的相对表达量在 5 个种群中最低，与敏感种群差异显著。因此，小菜蛾的 nAChR α 亚基与果蝇的 nAChR Dα6 相似，可能均为多杀菌素的作用靶标（Perry *et al.*，2007）。对于多杀菌素对小菜蛾 nAChR α 亚基的具体作用机理，以及是否会同样引起 nAChR α 亚基的不表达而产生抗性的问题，还需要进一步的研究。Li 等（2007）比较了滞育和正常家蝇蛹的脑部蛋白组，在滞育蛹中，脂肪酸结合蛋白的表达量明显下调，而脂肪酸结合蛋白与炎症、代谢和免疫反应通路密切相关，该蛋白在敏感品系中未鉴定出来，可能是表达量过低或者表达受到抑制，进而影响小菜蛾体内脂肪的代谢，推测其与抗药性有一定关系。同样可以推测，在幼虫阶段，小菜蛾在多杀菌素多代胁迫下 nAChR α 亚基基因表达量的降低可能会影响细胞活性，导致增殖缺陷或细胞凋亡，从而使小菜蛾无法抵御多杀菌素毒害，该差异表达为进一步研究多杀菌素的作用靶标和作用机理，了解杀虫剂抗性机制的产生提供了依据。

参考文献（References）

Bao WX, Narai Y, Nakano A, Kaneda T, Murai T, Sonoda S, 2014. Spinosad resistance of melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in α6 subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 112（1）：51－55.

El-Sheikh ESA, 2015. Comparative toxicity and sublethal effects of emamectin benzoate, lufenuron and spinosad on *Spodoptera littoralis* Boisd.（Lepidoptera：Noctuidae）. *Crop Prot.*, 67：228－234.

Gong YH, Xu BY, Zhang YJ, Gao XW, Wu QJ, 2015. Demonstration of an adaptive response to preconditioning *Frankliniella occidentalis*（Pergande）to sublethal doses of spinosad：a hormetic-dose response. *Ecotoxicology*, 24（5）：1141－1151.

Herron GA, Gunning RV, Cottage EL, Borzatta V, Gobbi C, 2014. Spinosad resistance, esterase isoenzymes and temporal synergism in *Frankliniella occidentalis*（Pergande）in Australia. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 114（1）：32－37.

Hou WJ, Liu QL, Tian LX, Wu QJ, Zhang YJ, Xie W, Wang SL, Miguel KS, Funderburk J, Scott JG, 2014. The α6 nicotinic acetylcholine receptor subunit of *Frankliniella occidentalis* is not involved in resistance to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 111（1）：60－67.

Hsu JC, Feng HT, 2006. Development of resistance to spinosad in

oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in laboratory selection and cross-resistance. *J. Econ. Entomol.*, 99(3): 931–936.

Lansdell SJ, Millar NS, 2004. Molecular characterization of Dα6 and Dα7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Drosophila*: formation of a high-affinity α-bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras. *J. Neurochem.*, 90(2): 479–489.

Li AQ, Popova-Butler A, Dean DH, Denlinger DL, 2007. Proteomics of the flesh fly brain reveals an abundance of upregulated heat shock proteins during pupal diapause. *J. Insect Physiol.*, 53(4): 385–391.

Li ZY, Zalucki MP, Bao HL, Chen HY, Hu ZD, Zhang DY, Lin QS, Yin F, Wang M, Feng X, 2012. Population dynamics and "outbreaks" of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in Guangdong province, China: climate or failure of management? *J. Econ. Entomol.*, 105(3): 739–752.

Liu BD, Li FL, He BL, Yu XZ, Li ZY, Cheng LG, 2010. Screening and analysis of the differential expressed sequence of diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 33(2): 91–95. [刘白朵, 李风良, 和碧蕾, 于希忠, 李忠英, 程罗根, 2010. 溴氰菊酯胁迫下小菜蛾差异表达基因的筛选与分析. 南京师大学报(自然科学版), 33(2): 91–95]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Morgan ET, 2001. Regulation of cytochromes P450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab. Dispos.*, 29(3): 207–212.

Orr N, Shaffner AJ, Richey K, Crouse GD, 2009. Novel mode of action of spinosad: receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 95(1): 1–5.

Perry T, Mckenzie JA, Batterham P, 2007. A Dα6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(2): 184–188.

Reyes M, Rocha K, Alarcón L, Siegwart M, Sauphanor B, 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 102(1): 45–50.

Shono T, Scott JG, 2003. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 75(1–2): 1–7.

Somers J, Nguyen J, Lumb C, Batterham P, Perry T, 2015. *In vivo* functional analysis of the *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor Dα6 using the insecticide spinosad. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 64: 116–127.

Sun LC, Ye YT, Sun HB, Yu J, Zhang L, Sun Y, Zhang DH, Ma L, Shen B, Zhu CL, 2013. Identification of proteasome subunit beta type 6 (PSMB6) associated with deltamethrin resistance in mosquitoes by proteomic and bioassay analyses. *PLoS ONE*, 8(6): e65859.

Sun LN, Yang DB, Rui CH, Cui L, Yuan HZ, 2012. Effects of chlorantraniliprole on expression abundance of ryanodine receptor gene mRNA from *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 14(2): 136–142. [孙丽娜, 杨代斌, 芮昌辉, 崔丽, 袁会珠, 2012. 氯虫苯甲酰胺对小菜蛾鱼尼丁受体基因 mRNA 表达量的影响. 农药学学报, 14(2): 136–142]

Thompson GD, Dutton R, Sparks TC, 2000. Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag. Sci.*, 56(8): 696–702.

Vogt C, Nowak C, Diogo JB, Oetken M, Schwenk K, Oehlmann J, 2007. Multi-generation studies with *Chironomus riparius* – effects of low tributyltin concentrations on life history parameters and genetic diversity. *Chemosphere*, 67(11): 2192–2200.

Wang D, Ren XX, Zhang XF, 2009. Research progress on resistance and its mechanism of spinosad. *World Pesticides*, 31(4): 7–10. [王东, 任学祥, 张晓芳, 2009. 多杀菌素抗性现状及其机理研究进展. 世界农药, 31(4): 7–10]

Wang J, Wang XL, Lansdell SJ, Zhang JH, Millar NS, Wu YD, 2016. A three amino acid deletion in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor α6 subunit confers high-level resistance to spinosad in *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 71: 29–36.

Xu ZH, Li JK, 2015. Effect of spinosad on the growth and development of *Ostrinia furnacalis* L. and *Musca domestica*. *China Plant Protection*, (8): 9–12. [徐志红, 李俊凯, 2015. 多杀菌素对亚洲玉米螟和家蝇生长发育的影响. 中国植保导刊, (8): 9–12]

Yin XH, Wu QJ, Li XF, Zhang YJ, Xu BY, 2008. Effect of sublethal concentrations of spinosad on the activities of detoxifying enzymes in the larvae of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 10(1): 28–34. [尹显慧, 吴青君, 李学峰, 张友军, 徐宝玉, 2008. 多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响. 农药学学报, 10(1): 28–34]

Yin XH, Wu QJ, Li XF, Zhang YJ, Xu BY, 2009. Demographic changes in multigeneration *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to sublethal concentrations of spinosad. *J. Econ. Entomol.*, 102(1): 357–365.

Zhang MF, Fan JY, Zhang HW, Zhang XZ, Ma XG, 2009. Research development of studies on neonicotinoid insecticides. *World Pesticides*, 31(1): 22–25, 52. [张梅凤, 范金勇, 张宏伟, 张秀珍, 马新刚, 2009. 新烟碱类杀虫剂的研究进展. 世界农药, 31(1): 22–25, 52]

Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RF, Thompson GD, Shelto AM, 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol.*, 95(2): 430–436.

Zhu H, Wang YF, Zhou XM, 2015. Characteristics of mRNA relative expression of *ABCG2* in *Plutella xylostella* and the effect of indoxacarb on its expression. *Plant Protection*, 41(6): 117–121. [朱航, 王雅菲, 周小毛, 2015. 小菜蛾 *ABGG2* mRNA 表达特征及茚虫威对其表达量的影响. 植物保护, 41(6): 117–121]

(责任编辑: 袁德成)